

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-93067

(P 2 0 0 3 - 9 3 0 6 7 A)

(43) 公開日 平成15年4月2日(2003.4.2)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09	ZNA	A61K 39/395	D 2G045
A61K 38/00			N 4B024
39/395		45/00	4B063
		A61P 19/06	4B065
45/00		C07K 14/47	4C084
審査請求 未請求 請求項の数21 O L (全19頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2001-290291(P 2001-290291)	(71) 出願人	597072006 遠藤 仁 神奈川県相模原市由野台 1-23-7
(22) 出願日	平成13年9月21日(2001.9.21)	(72) 発明者	遠藤 仁 神奈川県相模原市由野台 1-23-7
		(72) 発明者	金井 好克 東京都八王子市台町 1丁目 2-3
		(72) 発明者	榎本 篤 愛知県名古屋守山区高島町388-4 ジデンスアムール 102号室
		(74) 代理人	100102668 弁理士 佐伯 憲生
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 腎臓及び胎盤型尿酸トランスポーターとその遺伝子

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 腎臓および胎盤における尿酸輸送に関する新規な尿酸トランスポーター遺伝子及びその遺伝子がコードするポリペプチドである尿酸トランスポーターを同定し、提供する。

【解決手段】 本発明は、特定のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、尿酸及びその類似物質を輸送する能力を有するタンパク質、及びタンパク質をコードする遺伝子に関する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】配列番号：1 に記載されたアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、尿酸及びその類似物質を輸送する能力を有するタンパク質。

【請求項 2】ヒト由来である請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 3】臓器、組織、もしくは培養細胞由来である請求項 1 又は 2 に記載のタンパク質。

【請求項 4】請求項 1 に記載のタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項 5】配列番号：1 に記載された塩基配列からなる DNA、又は該 DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、尿酸及びその類似物質を輸送、もしくは尿酸と他の陰イオンを交換輸送する能力を有するタンパク質をコードする DNA。

【請求項 6】ヒト由来である請求項 5 に記載の遺伝子。

【請求項 7】臓器、組織、もしくは培養細胞由来である請求項 5 又は 6 に記載の遺伝子。

【請求項 8】請求項 4 ～ 7 のいずれかの項に記載の遺伝子もしくは該遺伝子の中のタンパク質をコードする遺伝子を含むプラスミド。

【請求項 9】プラスミドが発現プラスミドである請求項 8 に記載のプラスミド。

【請求項 10】請求項 8 又は 9 に記載のプラスミドで形質転換された宿主細胞。

【請求項 11】配列番号 1 で示される塩基配列の中の連続する 14 塩基以上の部分配列もしくはその相補的な配列を含むヌクレオチド。

【請求項 12】尿酸及びその類似物質を輸送、もしくは尿酸と他の陰イオンを交換輸送する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子を検出するためのプローブとして使用するものである請求項 11 に記載のヌクレオチド。

【請求項 13】尿酸及びその類似物質を輸送、もしくは尿酸と他の陰イオンを交換輸送する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子の発現を変調させるために使用するものである請求項 11 に記載のヌクレオチド。

【請求項 14】請求項 1 ～ 3 のいずれかの項に記載するタンパク質に対する抗体。

【請求項 15】請求項 1 ～ 3 のいずれかの項に記載のタンパク質を用いて、該タンパク質の有する尿酸及びその類似物質を輸送、もしくは尿酸と他の陰イオンを交換輸送する能力に対する被検物質の基質としての作用を検出する方法。

【請求項 16】請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載のタンパク質を用いて、尿酸排泄調整作用を有する物質をスクリーニングする方法。

【請求項 17】請求項 16 に記載の方法によりスクリーニングされ得る尿酸排泄調整剤。

【請求項 18】請求項 1 ～ 3 のいずれかの項に記載のタンパク質、その特異抗体、その機能促進物質あるいは機能抑制物質を用いて、該タンパク質の有する尿酸及びその類似物質を輸送、もしくは尿酸と他の陰イオンを交換輸送する能力を変調させることにより、該タンパク質によって輸送される尿酸及びその類似物質の腎臓及び胎盤での動態を変更する方法。

【請求項 19】請求項 1 ～ 3 のいずれかの項に記載のタンパク質、その特異抗体、その機能促進物質あるいは機能抑制物質を用いて、該タンパク質の有する尿酸及びその類似物質を輸送、もしくは尿酸と他の陰イオンを交換輸送する能力を変調させることにより、該タンパク質によって輸送される尿酸及びその類似物質の腎臓及び胎盤での動態に与える影響を変更する方法。

【請求項 20】請求項 1 ～ 3 のいずれかの項に記載のタンパク質、その特異抗体、その機能促進物質あるいは機能抑制物質を用いて、該タンパク質の有する尿酸及びその類似物質を輸送、もしくは尿酸と他の陰イオンを交換輸送する能力を変調させることにより、該タンパク質によって輸送される尿酸及びその類似物質の全身血中濃度に与える影響を変更する方法。

【請求項 21】請求項 1 ～ 3 のいずれかの項に記載のタンパク質、その特異抗体、その機能促進物質あるいは機能抑制物質、それをコードする cDNA（相補的 DNA）を用いて、該タンパク質を特定の細胞に過剰発現させるか、あるいはすでに細胞に存在する該タンパク質の有する尿酸及びその類似物質を輸送する能力を変調させることにより、該タンパク質によって輸送される尿酸及びその類似物質の腎臓、あるいは胎盤における動態に与える影響を検出および変更する方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は腎臓及び胎盤における尿酸及びその類似物質の輸送、もしくは尿酸と他の陰イオンの交換輸送に関与する遺伝子と、その遺伝子がコードするポリペプチドに関する。

【0002】

【従来の技術】人類と霊長類において、有機酸である尿酸は細胞内におけるプリン代謝の最終代謝産物であり、主に腎臓から排泄される。人類と霊長類以外の種では、肝臓の尿酸酸化酵素（ユリケース）の働きによりさらにアラントインまで代謝されて腎臓より排泄される。したがって他の哺乳類にとっては、中間代謝産物である尿酸の腎臓における動態異常の生体に及ぼす影響は少ないと考えられる。人類が古代より、高尿酸血症による痛風を患ってきたのはユリケースの働きを、その進化の過程のなかで失ったことが原因と考えられる。

【0003】ヒトにおいて、腎臓における尿酸の排泄低下により高尿酸血症をきたすと、痛風を高率に発症し、心血管系疾患や高血圧の危険因子となる。一方、腎性低

10

20

30

40

50

尿酸血症は、腎臓における尿酸排泄亢進が成因であることが知られている。これらの疾患の尿酸動態の異常は明らかではないが、腎臓における尿酸の輸送体（トランスポーター）が深く関わっていることが、これまで推測されてきた。腎臓における尿酸の動態については、これまで摘出臓器灌流法や単離細胞膜小胞系などを用いた実験系により研究されてきた。ヒトにおいて、尿酸は腎臓糸球体を自由に通過し、その後近位尿細管において再吸収及び分泌の機構が存在することが明らかにされている。しかし従来の手法では、細胞膜を介した尿酸輸送系について詳細に解析することは困難であり、トランスポーターそのものを単離して解析することが望まれてきた。

【0004】尿酸の腎臓における輸送には、著しい種差が存在し、ブタやウサギのような分泌優位の種と、ヒト、ラットやイヌのような再吸収優位の種が存在することが知られている。分泌優位の種であるブタは、単位ネフロンあたり200～300%の尿酸排泄を行うが、尿酸再吸収優位の種であるヒトは、単位ネフロンあたり10%程度の尿酸排泄しか行わない。また同じ尿酸再吸収優位の種間でも、尿酸排泄促進薬や尿酸排泄抑制薬に対する反応が異なることが知られている。このように、種により腎臓における尿酸の動態や薬物に対する反応が異なり、また両方向性の輸送が行われているため、その存在が想定されているにも関わらず、尿酸輸送体の分子の実体の単離は容易ではなかった。

【0005】腎臓における尿酸輸送体のなかでも、尿細管管腔より尿酸を再吸収する輸送体は古くより単離細胞膜小胞系などを用いた実験系により研究されてきた。現在、高尿酸血症及び痛風の患者に対して用いられている種々の薬剤は、腎臓において尿酸を再吸収する輸送体を抑制することが想定されている。またこの輸送体の遺伝子異常により、腎性低尿酸血症が発症することが予想されている。近年、尿酸の再吸収を司る輸送体は、尿酸と種々の陰イオンの交換輸送体であることが、様々な実験において明らかにされてきた。抗結核薬として現在も第一選択薬として用いられているピラジナミドは、その代謝産物であるピラジンカルボン酸が、この交換輸送体の交換基質となり、尿酸再吸収を促進することが明らかになっている。抗結核薬を投与されている患者に高率にみられる高尿酸血症の原因と考えられている。

【0006】このように、腎臓における尿酸の再吸収を担う輸送体は、尿酸の体内動態に関して重要な役割を担っていると考えられ、その分子の実体を解明することで、尿酸排泄促進薬の作用機序、腎性低尿酸血症の原因解明及び新たな痛風治療薬の開発に広がるものと期待されてきた。

【0007】我々は、以前に腎臓、肝臓、脳、胎盤などにおける薬物輸送において中心的役割を果たしている有機アニオントランスポーターOAT (organic anion transporter) 1 (Seki

ne, T. et al., J. Biol. Chem., 第272巻, 18526-18529頁, 1997年), OAT2 (Sekine, T. et al., FEBS letter, 第429巻, 179-182頁, 1998年), OAT3 (Kusuhara, H. et al., J. Biol. Chem., 第274巻, 13675-13680頁, 1999年), 及びOAT4 (Cha, S. H. et al., J. Biol. Chem., 第275巻, 4507-4512頁, 2000年) を単離し報告してきた。OATファミリーに属するこれらのトランスポーターは化学構造の異なる多くの有機アニオンを輸送することの出来るトランスポーターであり、種々のアニオン性薬物の輸送も行っている。

【0008】尿酸の輸送体については、既知のトランスポーターファミリーに属するかは明らかではなかったが、尿酸はピリミジン構造とイミダゾール構造を併せ持つ2塩基酸であり、有機アニオンの一つであることより尿酸トランスポーターは発生学的にOATファミリーに属する可能性が予想された。OATファミリーのうちOAT4は腎臓の尿細管管腔側に存在しており、尿酸の再吸収を担う輸送体も管腔側にその存在が想定されていることより、発生学的にOAT4に近いものであることも予想された。これらの事実から、我々は、腎臓における尿酸トランスポーターが有機イオントランスポーターファミリーに属するものであることを予測した。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、腎臓における尿酸輸送に関与する新規な尿酸トランスポーター遺伝子およびその遺伝子がコードするポリペプチドである尿酸トランスポーターを同定し、提供することにある。その他の目的については以下の記載より明白である。

【0010】

【問題を解決するための手段】本発明者らは既に述べたように、4つの有機アニオントランスポーターOAT1、OAT2、OAT3およびOAT4を単離した。これらは相互に40%前後のアミノ酸配列の相同性を有している。これらの配列をもとに、ヒトゲノム計画の公開情報を検索し、OAT1、2、3および4と相同性を有する新規遺伝子断片を複数同定した。このうちOAT4の遺伝子座位にきわめて近い新規遺伝子断片の1つを解析し、その中に開始コドンと思われる部位を同定した。この開始コドンの3'上流に特異的プライマーを作製し、ヒトの様々な組織由来のメッセンジャーRNAを用いた3'-RACE (3'-rapid amplification of cDNA ends) 法により、この新規遺伝子の単離を試みた。その結果、ヒト腎臓メッセンジャーRNAを用いた3'-RACE法によりこれまでに報告のない新規クローン (URT1) を同

定した。

【0011】本発明の尿酸トランスポーター URT1 (urate transporter 1) は、尿酸およびその類似物質を細胞膜を介して一方より他方に輸送する能力を有し、さらに細胞膜の他方の陰イオンを交換基質とする交換輸送体 (urate/anion exchanger) である。本発明のタンパク質としては、配列番号1で示されたアミノ酸配列を有するもののほか、例えば、配列番号1で示されたアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有するものが挙げられる。アミノ酸の欠失、置換もしくは付加は、尿酸輸送活性が失われない程度であればよく、通常1?約110個、好ましくは1?約55個である。このようなタンパク質は、配列番号1で示されたアミノ酸配列と通常、?75%、好ましくは?90%のアミノ酸配列の相同性を有する。

【0012】本発明において、3'-RACE法による遺伝子の単離は、通常、遺伝子開始コドンの3'側上流にグアニンあるいはシトシンに富む遺伝子特異的プライマーを30塩基ほどで作製し、アダプター配列のついたオリゴdTプライマーで組織由来のメッセンジャーRNAより逆転写反応を行った後、アダプター配列と遺伝子特異的プライマーでPCR (ポリメラーゼ連鎖反応) を行うことにより実施できる。PCRの正確性をより高めるためには、よりfidelityの高い耐熱性ポリメラーゼを用いることにより実施できる。

【0013】本発明の尿酸トランスポーター遺伝子は、適当な哺乳動物の腎臓もしくは胎盤の組織や細胞を遺伝子源として用いて作製したcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより単離取得できる。哺乳動物としては、イヌ、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、サル、ブタ、ウサギ、ラット、マウスなどの非ヒト動物のほか、ヒトが挙げられる。遺伝子のスクリーニングおよび単離は、ホモロジースクリーニングおよびPCR法などにより好適に実施できる。得られたcDNAについては、常法により塩基配列を決定し、翻訳領域を解析して、これにコードされるタンパク質、即ちURT1のアミノ酸配列を決定することができる。

【0014】得られたcDNAが尿酸トランスポーターのcDNAであること、即ちcDNAにコードされた遺伝子産物が尿酸トランスポーターであることは、例えば次のようにして検証することができる。得られたURT1 cDNAから調製したcRNA (相補的RNA) を卵母細胞に導入して発現させ、尿酸を細胞内に輸送する (取り込む) 能力を、尿酸を基質とする通常の実験 (Sekine, T et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 第251巻、586-591頁、1998年) により、細胞内への基質取り込みを測定することにより確認できる。また、発現細胞に同様の取り込み実験を

用いて、URT1の輸送特性や基質特異性などを調べることができる。また、発現細胞について、同様の取り込み実験を応用して、URT1の特性、例えば、URT1が時間依存性の輸送を行っているという特性や、URT1の基質選択性、pH依存性などを調べることができる。

【0015】得られたURT1遺伝子のcDNAを用いて、異なる遺伝子源で作製された適当なcDNAライブラリー又はゲノミックDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、異なる組織、異なる生物由来の相同遺伝子や染色体遺伝子等を単離することができる。また、開示された本発明の遺伝子の塩基配列 (配列番号1) に示された塩基配列、もしくはその一部) の情報に基づいて設計された合成プライマーを用い、通常のPCR法によりcDNAライブラリーから遺伝子を単離することが出来る。

【0016】cDNAライブラリー及びゲノミックDNAライブラリー等のDNAライブラリーは例えば、「Molecular Cloning; Sambrook, J., Fritsch, E. F. およびManiatis, T. 著、Cold Spring Harbor Laboratory Pressより1989年に発刊」に記載の方法により調製することができる。あるいは、市販のライブラリーがある場合にはこれを用いてもよい。

【0017】URT1遺伝子のヒトゲノム上における構造を得るには、得られたCT2遺伝子のcDNAを用いて、ゲノミックDNAライブラリーをスクリーニングし、得られたクローンを解析する。あるいは公開されているヒトゲノム解析結果の情報をもとにホモロジー検索プログラムを用いてこれを探索してもよい。

【0018】本発明の尿酸トランスポーター (URT1) は、例えば、尿酸トランスポーターをコードするcDNAを用い、遺伝子組み換え技術により生産することができる。例えば、尿酸トランスポーターをコードするDNA (cDNA等) を適当な発現ベクターに組み込み、得られた組み換えDNAを適当な宿主細胞に導入することができる。ポリペプチドを生産するための発現系 (宿主ベクター系) としては、例えば、細菌、酵母、昆虫細胞および哺乳動物細胞の発現系等が挙げられる。このうち、機能タンパクを得るためには、昆虫細胞および哺乳動物細胞を用いることが望ましい。

【0019】例えば、ポリペプチドを哺乳動物で発現させる場合には、尿酸トランスポーターをコードするDNAを、適当な発現ベクター (例えば、レトロウイルスベクター、パピローマウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、SV40系ベクター等) 中の適当なプロモーター (例えばSV40プロモーター、LTRプロモーター、エロンゲーション1 $\alpha$ プロモーター等) の下流に挿入して発現ベクターを構築する。次に、得られた

発現ベクターで適当な動物細胞を形質転換して、形質転換体を適当な培地で培養することによって、目的とするポリペプチドが生産される。宿主とする哺乳動物細胞としては、サルCOS-7細胞、チャイニーズハムスターCHO細胞、ヒトHeLa細胞または、腎臓組織由来の初代培養細胞や、タタキ由来LLC-PK1細胞、フクロネズミ腎由来OK細胞、マウス由来近位尿管S1、同S2、同S3細胞等の細胞株が挙げられる。

【0020】尿酸トランスポーターURT1をコードするcDNAとしては、例えば、配列1に示される塩基配列を有するcDNAを用いることが出来るほか、前記のcDNAに限定されることなく、アミノ酸配列に対応するDNAを設計し、ポリペプチドをコードするDNAを用いることもできる。この場合、一つのアミノ酸をコードするコドンは各々1?6種類知られており、用いるコドンの選択は任意でよいが、例えば発現に利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、より発現の高い配列を設計することができる。設計した塩基配列をもつDNAはDNAの化学合成、前記cDNAの断片化と結合、塩基配列の一部改変等によって取得できる。人為的な塩基配列の一部改変、変異導入は、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用して部位変異導入法 (site specific mutagenesis) 「Mark, D. F. ら, Proc Natl Acad Sci USA 第18巻, 5662-5666頁, 1984年」等により実施できる。

【0021】本発明の尿酸トランスポーター遺伝子にストリンジントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド (オリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチド) は、尿酸トランスポーター遺伝子を検出するためのプローブとして使用できるほか、尿酸トランスポーターの発現を変調させるために、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、やりボザイム、デコイとして使用することもできる。このようなヌクレオチドとしては、例えば、配列番号1で示される塩基配列の中の通常、連続する14塩基以上の部分配列もしくはその相補的な配列を含むヌクレオチドを用いることができ、ハイブリダイズをより特異的とするためには、部分配列としてより長い配列、例えば20塩基以上あるいは30塩基以上の配列を用いても良い。

【0022】また、本発明の尿酸トランスポーターまたは、これと免疫学的同等性を有するポリペプチドを用いて、その抗体を取得することが出来、抗体は、尿酸トランスポーター検出や精製などに利用できる。抗体は、本発明の尿酸トランスポーター、その断片、またはその部分配列を有する合成ペプチド等を抗原として用いて製造できる。ポリクロナール抗体は、宿主動物 (たとえば、ラットやウサギ) に抗原を接種し、免疫血清を回収する通常の方法により製造することができ、モノクロナール

抗体は、通常のハイブリドーマ法などの技術により製造できる。

【0023】さらに、本発明は尿酸排泄促進作用を有する物質のスクリーニング方法を提供するものである。本発明のタンパク質は、尿酸を細胞内に輸送するためのものであり、尿酸の再吸収に深くかかわっている。また、図6、図8、9及び図10に示されるように本発明のタンパク質の発現している系に尿酸を添加し、さらにスクリーニング物質を添加して尿酸の取り込み量をスクリーニング物質の無添加の場合と比較することにより、その系におけるスクリーニング物質の尿酸の取り込みについての促進作用又は阻害作用を定量化することができる。図6及び図8に示されるように、臨床において尿酸排泄促進剤として使用されている物質が顕著に前記実験系において尿酸の取り込みを阻害していることから、この系においてスクリーニング物質における尿酸排泄促進作用をスクリーニングすることが可能となることがわかる。このスクリーニング系において使用される細胞としては、下記の実験において使用されている卵母細胞に限定されるものではなく、本発明のタンパク質を発現し得る細胞であれば各種の生体細胞を使用することができる。

【0024】したがって、本発明は、本発明のタンパク質を用いて尿酸排泄調整作用を有する物質をスクリーニングする方法を提供するものである。本発明の尿酸排泄調整作用としては、尿酸の排泄促進作用又は尿酸の排泄阻害作用があり、高尿酸症や痛風などの治療、予防には尿酸排泄促進作用を有するものが好ましいことから、好ましい尿酸排泄調整作用としては、尿酸排泄促進作用が挙げられる。さらに、本発明は前記したスクリーニング方法によりスクリーニングされた尿酸排泄調整剤を提供するものである。好ましい尿酸排泄調整剤としては、尿酸排泄促進剤が挙げられる。本発明の方法によりスクリーニングされた尿酸排泄調整剤は、腎臓などにおける尿酸輸送に関与する尿酸トランスポーターによる尿酸の取り込みを調整することができることから、高尿酸症や痛風などの尿酸の再吸収に関連する各種疾患の治療、予防の医薬の有効成分として使用することができる。このようにして得られた有効成分を製薬上許容される担体を用いて医薬組成物とすることができる。

#### 【0025】

【実施例】以下、実施例をもって本説明をさらに詳しく説明するが、これらの実施例は本発明を制限するものではない。なお下記実施例において、各操作は特に断りがない限り、「Molecular Cloning: Sambrook, J., Fritsh, E. F. およびManiatis, T. 著, Cold Spring Harbor Laboratory Pressより1989年に発刊」に記載の方法により行うか、または、市販のキットを用いる場合には市販品の指示書に従って使用した。

【0026】実施例1 腎臓及び胎盤特異的尿酸トランスporter (URT1) cDNAの単離とその解析

既に我々が単離したOAT1、OAT2、OAT3、及びOAT4の塩基配列情報をもとに、公開されているヒトゲノム計画の解析結果をホモロジー探索プログラムを用いて探索した。この結果、OAT1、OAT2、OAT3、OAT4と相同性を有する新規遺伝子断片を複数得た。この中で、OAT4の遺伝子座位にきわめて近い新規遺伝子断片の1つを解析し、その中に開始コドンと思われる部位を同定した。この開始コドンの同定は新規遺伝子断片をOAT1及びOAT4の遺伝子配列と比較することにより得られた。予測された開始コドンの3'側上流に特異的プライマーを28塩基を用いて作製し、ヒトの様々な組織由来のメッセンジャーRNAを用いた3'-RACE (3'-rapid amplification of cDNA ends) 法により、この新規遺伝子の単離を試みた。その結果、ヒト腎臓メッセンジャーRNAを用いた3'-RACE法により単一のクローン (URT1) を得た。PCR法により得られた単一のバンドをTAクローニング法を用いて、pCRII-TOPOベクターにサブクローン化したのち、さらに発現ベクターであるp cDNA 3.1 (+) ベクターにサブクローン化した。この結果、尿酸輸送活性を持つ新規cDNA (URT1 cDNA) が得られた (輸送機能解析については以下参照)。上記により得られたcDNA (URT1 cDNA) の塩基配列の決定は、特異的プライマーを用いて、自動シーケンサー (アプライドバイオシステム社製) によりおこなった。 (配列番号1に記載)

ヒトの各組織におけるUAE1遺伝子の発現 (ノーザンブロットング) の解析を行った (図1)。URT1 cDNAの全長を32P-dCTPでラベルし、これをプローブとして用いて、ヒトの種々の組織から抽出したRNAをブロットングしたフィルター (クロンテック社製) を用いてハイブリダイゼーションを行った。標識後のUAE1 cDNA全長を含んだハイブリダイゼーション液で一晩ハイブリダイゼーションを行い、フィルターを65℃にて、0.1% SDSを含む0.1x SSCで洗浄した。ノーザンブロットの結果、腎臓に加えて胎盤組織において、強いバンドが検出された。ヒト胎児組織では腎臓においてバンドが検出された。URT1 cDNAを含むプラスミドから、T7 RNAポリメラーゼを用いて、in vitroでcRNA (cDNAに相補的なRNA) を調製した (Sekine, T., et al., J. Biol. Chem., 第272巻、18526-18529頁、1997年参照)。

【0027】実施例2 尿酸トランスporter機能の解析

得られたcRNAを、既に報告されている方法に従い (Sekine, T., et al., J. Biol. Chem., 第272巻、18526-18529頁、1997年)、アフリカツメガエルの卵母細胞に注入し、この卵母細胞について放射能標識された尿酸による取り込み実験を行った。この結果、図2に示すようにURT1を発現させた卵母細胞は[14C]尿酸の取り込みを示すことが判明した。URT1を発現させた卵母細胞は[14C]尿酸の取り込みの時間依存性を示した。このことから、URT1は単に尿酸と結合するだけではなく、細胞内に輸送するトランスporterであることが示された。有機イオントランスporterファミリーの代表的な基質である[14C]PAH (パラアミノ馬尿酸) 及び[14C]TEA (テトラエチルアンモニウム) の取り込みは認められなかった (図には示さず)。URT1の尿酸輸送のミカエリス-メンテン動力学試験をおこなった。種々の濃度の尿酸のURT1による取り込み量の変化を調べることににより、尿酸のURT1による輸送の濃度依存性を検討した。放射能標識された尿酸の取り込み実験は、URT1 cRNAを注入した卵母細胞を用い、前記記載方法に準じて実施した。この結果 (図3)、尿酸の取り込みのKm値 (ミカエリス定数) は約 $37.2 \pm 2.5$  mMであった。URT1の尿酸輸送における各種電解質の影響を検討した (図4)。細胞外ナトリウムをリチウム、コリン及びN-メチル-D-グルカミン (NMDG) に置換した場合、URT1を介した尿酸の輸送は変化せず、URT1が細胞外ナトリウム非依存性の尿酸トランスporterであることが明らかとなった。細胞外のカリウムイオンをすべてナトリウムで置換した場合 (図4, 0-K+)、およびナトリウムをすべてカリウムイオンで置換した場合 (96 mM KCl) も尿酸の輸送は変化せず、URT1細胞膜電位に非依存性であることが明らかとなった。細胞外のクロライドイオンをグルコン酸で置換した場合、尿酸の取り込みは有意に増加した。単離細胞膜小胞系などを用いた実験系により、ヒト腎臓の尿細管管腔側に、尿酸とクロライドイオンの交換輸送体の存在が示されており、本実験結果もクロライドが尿酸との交換基質となることを示唆するものといえる。URT1の尿酸輸送におけるpH依存性を検討した。図5に示すように、細胞外のpHをより酸性にしたところ、URT1 cRNAを注入した卵母細胞の尿酸輸送は増加したが、これは水を注入した卵母細胞 (対照) における尿酸の非特異的吸着が原因と考えられた。実質の尿酸輸送 (URT1-対照) はpHによって変化しなかった。

【0028】実施例3 尿酸トランスporterにおける尿酸の交換基質の検討

単離細胞膜小胞系などを用いた実験系により、ヒト腎臓の尿酸/陰イオン交換輸送体は乳酸、ニコチン酸などのモノカルボン酸が尿酸との交換基質となりうることが示

唆されている。URT1の尿酸の交換基質を検討するため、これらのモノカルボン酸(1mM)、パラアミノ馬尿酸、及びケトグルタル酸で卵母細胞をブレインキューベートしたのちに尿酸の輸送を測定した(図6)。1mMのピラジンカルボン酸及びニコチン酸(3-ピリジンカルボン酸)でブレインキューベートした場合、URT1 cRNAを注入した卵母細胞では尿酸の取り込みが有意に増加した。一方、モノカルボン酸ではないパラアミノ馬尿酸やケトグルタル酸でブレインキューベートした場合は尿酸の取り込みを促進しなかった。以上の結果は、ピラジンカルボン酸やニコチン酸などのモノカルボン酸が尿酸との交換基質となっていることを示している。図6において、モノカルボン酸である乳酸でブレインキューベートした場合は尿酸の取り込みを促進しなかった。卵母細胞は内因性の乳酸トランスポーターを豊富に発現しているため、取り込まれた乳酸がURT1以外の経路で細胞外に輸送されてしまうためと考えられた。また後に示すようにURT1に対する乳酸の親和性が低いことも原因と予想された。そこで、あらかじめ100mMの放射能非標識のL-乳酸を100nM注入したのち、放射能標識された尿酸の取り込みを観察した(図7)。乳酸をあらかじめ注入した場合、水を注入した場合と比べて有意に高い尿酸の取り込みが観察された。パラアミノ馬尿酸、及びケトグルタル酸を注入しても尿酸の取り込みは、水を注入した場合と変化がみられなかった(図には示さず)。図6及び図7の結果より、URT1は尿酸とモノカルボン酸との交換輸送体(exchanger)である。抗結核薬であるピラジナミドは代謝されてピラジンカルボン酸となり尿中に排泄されるが、一方腎臓での尿酸の再吸収を促進するといわれている。以上の結果はURT1において尿酸とピラジンカルボン酸が交換輸送される結果、尿酸の取り込みが促進されることを示しており、抗結核薬であるピラジナミドの副作用とされる高尿酸血症を引き起こす機序が明らかにされた。

#### 【0029】実施例4 尿酸トランスポーターの阻害物質のスクリーニング

URT1の基質選択性をさらに検討するために、URT1 cRNAを注入した卵母細胞による[14C]尿酸の取り込み実験系において、系へ各種物質を添加し、その影響を調べた(阻害実験)。<sup>40</sup> [14C]尿酸の取り込み実験は、URT1 cRNAを注入した卵母細胞を用い、前記記載方法に準じて実施した(図8、9、10)。図8に示した濃度の各種化合物(非標識)の存在下および非存在下で、50mM [14C]尿酸の取り込みをpH 7.4の条件下で測定した。その結果、種々のモノカルボン酸(L-乳酸、D-乳酸、ニコチン

酸、ピラジンカルボン酸)はURT1による[14C]尿酸の輸送を有意に阻害した(図8)。ジカルボン酸であり、OAT1の交換基質となりうるケトグルタル酸はpH 7.4の条件下では阻害しなかった。ピラジンカルボン酸と似た構造をもつピラジンジカルボン酸はやや弱い阻害効果を示した。パラアミノ馬尿酸やテトラエチルアンモニウムのようなアニオン性物質及びカチオン性物質は阻害作用を示さなかった(図8)。高尿酸血症の治療に用いられているプロベネシド、ベンズプロマロン、スルフィンピラゾン、フェニルブタゾンなどの薬剤は、URT1における尿酸の取り込みを有意に阻害した。また高血圧治療薬であるロサルタンは、尿酸排泄促進作用があることが知られているが、ロサルタンもその代謝産物であるEXP-3174と同様にURT1の尿酸の取り込みを有意に阻害した。以上の結果から、URT1は現在臨床で用いられている代表的な尿酸排泄促進薬の作用点である。プロベネシドとロサルタンの様々な濃度を用いて、URT1における尿酸取り込み作用に対する阻害効果を調べた(図9及び図10)。IC50値はそれぞれ約50mM、20mMであった。

【0030】実施例5 URT1遺伝子の構造解析  
URT1遺伝子のヒトゲノムにおける構造を解析した。ホモロジー検索プログラムを利用して公開されているヒトゲノム解析結果の情報を探索したところ、URT1遺伝子のエクソン・イントロン構造が明らかになった。図11に示すように

【0031】URT1遺伝子は10のエクソンからなり、開始コドンは第1エクソンに存在した。

【0032】

【発明の効果】本発明の尿酸を選択的に輸送する腎臓および胎盤特異的尿酸トランスポーター及びその遺伝子は当該トランスポーターの発現箇所での尿酸及び尿酸類似物質の輸送のインビトロでの検討や、それを基にした化合物の体内動態の予測を可能とする。尿酸は高尿酸血症や通風と深い関わりのある因子であり、当該トランスポーターの発明は将来高尿酸血症及び痛風の病因解明に寄与するものと考えられる。当該トランスポーターは腎臓において尿酸を再吸収する働きを有しており、尿酸再吸収機構の欠損した腎性低尿酸血症の原因遺伝子解明に寄与すると考えられる。さらに、当該トランスポーターの機能を抑制する新規化合物、及び発現を変調する制御因子を解明することにより、高尿酸血症及び痛風の新たな治療法の開発に寄与することができる。

【0033】

【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> Endou Hitoshi, Kyorin University, School of Medicine

<120> kidney and placental urate transporter and gene thereof

<130> urate transporter

13

14

&lt;140&gt; 000

&lt;141&gt; 2001-09-21

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 2642

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (148)..(1809)

&lt;300&gt;

&lt;400&gt; 1

gccccgagtc tgtgaagcct agccgctggg ctggagaagc cactgtgggc accaccgigg 60

gggaaacagg cccgtigccc iggcciciti gccctgggcc agccitigig aagtgggccc 120  
ctcttciggg cccctigagi aggticc atg gca ttt tct gaa ctc ctg gac ctc 174

Met Ala Phe Ser Glu Leu Leu Asp Leu

1

5

gtg ggt ggc ctg ggc agg ttc cag gti ctc cag acg atg gct ctg atg 222  
Val Gly Gly Leu Gly Arg Phe Gln Val Leu Gln Thr Met Ala Leu Met

10

15

20

25

gtc tcc atc atg tgg ctg tgi acc cag agc atg ctg gag aac ttc tcc 270  
Val Ser Ile Met Trp Leu Cys Thr Gln Ser Met Leu Glu Asn Phe Ser

30

35

40

gcc gcc gtg ccc agc cac cgc tgc tgg gca ccc ctc ctg gac aac agc 318  
Ala Ala Val Pro Ser His Arg Cys Trp Ala Pro Leu Leu Asp Asn Ser

45

50

55

acg gct cag gcc agc atc cta ggg agc ttg agt cct gag gcc ctc ctg 366  
Thr Ala Gln Ala Ser Ile Leu Gly Ser Leu Ser Pro Glu Ala Leu Leu

60

65

70

gct att tcc atc ccg ccg ggc ccc aac cag agg ccc cat cag tgc cgc 414  
Ala Ile Ser Ile Pro Pro Gly Pro Asn Gln Arg Pro His Gln Cys Arg

75

80

85

cgc ttc cgc cag cca cag tgg cag ctc ttg gac ccc aat gcc acg gcc 462  
Arg Phe Arg Gln Pro Gln Trp Gln Leu Leu Asp Pro Asn Ala Thr Ala

90

95

100

105

acc agc tgg agc gag gcc gac acg gag ccg tgt gtg gat ggc tgg gtc 510  
Thr Ser Trp Ser Glu Ala Asp Thr Glu Pro Cys Val Asp Gly Trp Val

110

115

120

tat gac cgc agc atc ttc acc tcc aca atc gtg gcc aag tgg aac ctc 558  
Tyr Asp Arg Ser Ile Phe Thr Ser Thr Ile Val Ala Lys Trp Asn Leu

125

130

135

gtg tgt gac tct cac gct ctg aag ccc atg gcc cag tcc atc tac ctg 606  
Val Cys Asp Ser His Ala Leu Lys Pro Met Ala Gln Ser Ile Tyr Leu

140

145

150

gct ggg att ctg gtg gga gct gct gcg tgc ggc cct gcc tca gac agg 654  
Ala Gly Ile Leu Val Gly Ala Ala Ala Cys Gly Pro Ala Ser Asp Arg

155

160

165

ttt ggg cgc agg ctg gtg cta acc tgg agc tac ctt cag atg gct gtg 702



15	16
Phe Gly Arg Arg Leu Val Leu Thr Trp Ser Tyr Leu Gln Met Ala Val	
170 175 180 185	
atg ggt acg gca gct gcc ttc gcc cct gcc ttc ccc gtg tac tgc ctg	750
Met Gly Thr Ala Ala Ala Phe Ala Pro Ala Phe Pro Val Tyr Cys Leu	
190 195 200	
ttc cgc ttc ctg ttg gcc ttt gcc gtg gca ggc gtc atg atg aac acg	798
Phe Arg Phe Leu Leu Ala Phe Ala Val Ala Gly Val Met Met Asn Thr	
205 210 215	
ggc act ctc ctg atg gag tgg acg gcg gca cgg gcc cga ccc ttg gtg	846
Gly Thr Leu Leu Met Glu Trp Thr Ala Ala Arg Ala Arg Pro Leu Val	
220 225 230	
atg acc ttg aac tct ctg ggc ttc agc ttc ggc cat ggc ctg aca gct	894
Met Thr Leu Asn Ser Leu Gly Phe Ser Phe Gly His Gly Leu Thr Ala	
235 240 245	
gca gtg gcc tac ggt gtg cgg gac tgg aca ctg ctg cag ctg gtg gtc	942
Ala Val Ala Tyr Gly Val Arg Asp Trp Thr Leu Leu Gln Leu Val Val	
250 255 260 265	
tgc gtc ccc ttc ttc ctc tgc ttt ttg tac tcc tgg tgg ctg gca gag	990
Ser Val Pro Phe Phe Leu Cys Phe Leu Tyr Ser Trp Trp Leu Ala Glu	
270 275 280	
tgc gca cga tgg ctc ctc acc aca ggc agg ctg gat tgg ggc ctg cag	1038
Ser Ala Arg Trp Leu Leu Thr Thr Gly Arg Leu Asp Trp Gly Leu Gln	
285 290 295	
gag ctg tgg agg gtg gct gcc atc aac gga aag ggg gca gtg cag gac	1086
Glu Leu Trp Arg Val Ala Ala Ile Asn Gly Lys Gly Ala Val Gln Asp	
300 305 310	
acc ctg acc cct gag gtc ttg ctt tca gcc atg cgg gag gag ctg agc	1134
Thr Leu Thr Pro Glu Val Leu Leu Ser Ala Met Arg Glu Glu Leu Ser	
315 320 325	
atg ggc cag cct cct gcc agc ctg ggc acc ctg ctc cgc atg ccc gga	1182
Met Gly Gln Pro Pro Ala Ser Leu Gly Thr Leu Leu Arg Met Pro Gly	
330 335 340 345	
ctg cgc ttc cgg acc tgt atc tcc acg ttg tgc tgg ttc gcc ttt ggc	1230
Leu Arg Phe Arg Thr Cys Ile Ser Thr Leu Cys Trp Phe Ala Phe Gly	
350 355 360	
ttc acc ttc ttc ggc ctg gcc ctg gac ctg cag gcc ctg ggc agc aac	1278
Phe Thr Phe Phe Gly Leu Ala Leu Asp Leu Gln Ala Leu Gly Ser Asn	
365 370 375	
atc ttc ctg ctc caa atg ttc att ggt gtc gtg gac atc cca gcc aag	1326
Ile Phe Leu Leu Gln Met Phe Ile Gly Val Val Asp Ile Pro Ala Lys	
380 385 390	
atg ggc gcc ctg ctg ctg ctg agc cac ctg ggc cgc cgc ccc acg ctg	1374
Met Gly Ala Leu Leu Leu Leu Ser His Leu Gly Arg Arg Pro Thr Leu	
395 400 405	
gcc gca tcc ctg ttg ctg gcg ggg ctc tgc att ctg gcc aac acg ctg	1422
Ala Ala Ser Leu Leu Leu Ala Gly Leu Cys Ile Leu Ala Asn Thr Leu	
410 415 420 425	
gtg ccc cac gaa atg ggg gct ctg cgc tca gcc ttg gcc gtg ctg ggg	1470

17 18

Val Pro His Glu Met Gly Ala Leu Arg Ser Ala Leu Ala Val Leu Gly

430 435 440

cig ggc ggg gtg ggg gct gcc ttc acc tgc atc acc atc tac agc agc 1518

Leu Gly Gly Val Gly Ala Ala Phe Thr Cys Ile Thr Ile Tyr Ser Ser

445 450 455

gag ctc ttc ccc act gtg ctc agg atg acg gca gtg ggc ttg ggc cag 1566

Glu Leu Phe Pro Thr Val Leu Arg Met Thr Ala Val Gly Leu Gly Gln

460 465 470

atg gca gcc cgt gga gga gcc atc cig ggg cct ctg gtc cgg ctg ctg 1614

Met Ala Ala Arg Gly Gly Ala Ile Leu Gly Pro Leu Val Arg Leu Leu

475 480 485

ggt gtc cat ggc ccc tgg ctg ccc ttg ctg gtg tat ggg acg gtg cca 1662

Gly Val His Gly Pro Trp Leu Pro Leu Leu Val Tyr Gly Thr Val Pro

490 495 500 505

gtg ctg agt ggc ctg gcc gca ctg ctt ctg ccc gag acc cag agc ttg 1710

Val Leu Ser Gly Leu Ala Ala Leu Leu Leu Pro Glu Thr Gln Ser Leu

510 515 520

ccg ctg ccc gac acc atc caa gat gtg cag aac cag gca gla aag aag 1758

Pro Leu Pro Asp Thr Ile Gln Asp Val Gln Asn Gln Ala Val Lys Lys

525 530 535

gca aca cat ggc acg ctg ggg aac tct gtc cta aaa tcc aca cag ttt 1806

Ala Thr His Gly Thr Leu Gly Asn Ser Val Leu Lys Ser Thr Gln Phe

540 545 550

tag cctccigagg aacctgcgat gggacggta gaggaagaga ctctctctgt 1859

tcctcggaga aggcaggagg aaagcaaaga cctccatttc cagaggccca gaggcctgccc 1919

tcctcaggct ccactctccc ccagggtctc cctccagggt gagecctgcc cctctcacag 1979

tcctcagggt ccccttcaat actgaagggtg aaaaggacag ttgatctggc aggaggctgac 2039

ccagctgacc atcaccctgc cctgccctcg tggcttcgga gagcagagggt gtcaggccca 2099

ggggaacgag ctggccttgc caacctctg ctgactccg cactgccact tgcctcccca 2159

cacctctcca cctgcccaga gctcagagct aaccaccatc catggtaag accctctcta 2219

gctccacaca agcagtagag tctcagctcc acagctttac ccagaagccc tctaagctcg 2279

gccccctggc cctcccaatg tccccccagg cctcagccac ctgcccggca catctctctg 2339

ctgctgtccc ctccccacc tcatccctga ccgactccac ttaaccccca aaccagccc 2399

ccctccagg ggtccagggt cagccctgaga tgcctctgaa actcctacc acagtacag 2459

ccacaagcct gccctctccc accctgccag cctatgagtt cccagagggt tggggcagtc 2519

ccatgacccc atgtccagc tccccacaca gcctctgggc agagaggcat tggctcgagg 2579

gattgaataa agaaacaaat gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2639

aaa 2642

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 553

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Met Ala Phe Ser Glu Leu Leu Asp Leu Val Gly Gly Leu Gly Arg Phe

1

5

10

15

Gln Val Leu Gln Thr Met Ala Leu Met Val Ser Ile Met Trp Leu Cys

19	20	25	30
Thr Gln Ser Met Leu Glu Asn Phe Ser Ala Ala Val Pro Ser His Arg			
35	40	45	
Cys Trp Ala Pro Leu Leu Asp Asn Ser Thr Ala Gln Ala Ser Ile Leu			
50	55	60	
Gly Ser Leu Ser Pro Glu Ala Leu Leu Ala Ile Ser Ile Pro Pro Gly			
65	70	75	80
Pro Asn Gln Arg Pro His Gln Cys Arg Arg Phe Arg Gln Pro Gln Trp			
85	90	95	
Gln Leu Leu Asp Pro Asn Ala Thr Ala Thr Ser Trp Ser Glu Ala Asp			
100	105	110	
Thr Glu Pro Cys Val Asp Gly Trp Val Tyr Asp Arg Ser Ile Phe Thr			
115	120	125	
Ser Thr Ile Val Ala Lys Trp Asn Leu Val Cys Asp Ser His Ala Leu			
130	135	140	
Lys Pro Met Ala Gln Ser Ile Tyr Leu Ala Gly Ile Leu Val Gly Ala			
145	150	155	160
Ala Ala Cys Gly Pro Ala Ser Asp Arg Phe Gly Arg Arg Leu Val Leu			
165	170	175	
Thr Trp Ser Tyr Leu Gln Met Ala Val Met Gly Thr Ala Ala Ala Phe			
180	185	190	
Ala Pro Ala Phe Pro Val Tyr Cys Leu Phe Arg Phe Leu Leu Ala Phe			
195	200	205	
Ala Val Ala Gly Val Met Met Asn Thr Gly Thr Leu Leu Met Glu Trp			
210	215	220	
Thr Ala Ala Arg Ala Arg Pro Leu Val Met Thr Leu Asn Ser Leu Gly			
225	230	235	240
Phe Ser Phe Gly His Gly Leu Thr Ala Ala Val Ala Tyr Gly Val Arg			
245	250	255	
Asp Trp Thr Leu Leu Gln Leu Val Val Ser Val Pro Phe Phe Leu Cys			
260	265	270	
Phe Leu Tyr Ser Trp Trp Leu Ala Glu Ser Ala Arg Trp Leu Leu Thr			
275	280	285	
Thr Gly Arg Leu Asp Trp Gly Leu Gln Glu Leu Trp Arg Val Ala Ala			
290	295	300	
Ile Asn Gly Lys Gly Ala Val Gln Asp Thr Leu Thr Pro Glu Val Leu			
305	310	315	320
Leu Ser Ala Met Arg Glu Glu Leu Ser Met Gly Gln Pro Pro Ala Ser			
325	330	335	
Leu Gly Thr Leu Leu Arg Met Pro Gly Leu Arg Phe Arg Thr Cys Ile			
340	345	350	
Ser Thr Leu Cys Trp Phe Ala Phe Gly Phe Thr Phe Phe Gly Leu Ala			
355	360	365	
Leu Asp Leu Gln Ala Leu Gly Ser Asn Ile Phe Leu Leu Gln Met Phe			
370	375	380	
Ile Gly Val Val Asp Ile Pro Ala Lys Met Gly Ala Leu Leu Leu Leu			
385	390	395	400
Ser His Leu Gly Arg Arg Pro Thr Leu Ala Ala Ser Leu Leu Leu Ala			
405	410	415	
Gly Leu Cys Ile Leu Ala Asn Thr Leu Val Pro His Glu Met Gly Ala			

420 425 430  
 Leu Arg Ser Ala Leu Ala Val Leu Gly Leu Gly Gly Val Gly Ala Ala  
 435 440 445  
 Phe Thr Cys Ile Thr Ile Tyr Ser Ser Glu Leu Phe Pro Thr Val Leu  
 450 455 460  
 Arg Met Thr Ala Val Gly Leu Gly Gln Met Ala Ala Arg Gly Gly Ala  
 465 470 475 480  
 Ile Leu Gly Pro Leu Val Arg Leu Leu Gly Val His Gly Pro Trp Leu  
 485 490 495  
 Pro Leu Leu Val Tyr Gly Thr Val Pro Val Leu Ser Gly Leu Ala Ala  
 500 505 510  
 Leu Leu Leu Pro Glu Thr Gln Ser Leu Pro Leu Pro Asp Thr Ile Gln  
 515 520 525  
 Asp Val Gln Asn Gln Ala Val Lys Lys Ala Thr His Gly Thr Leu Gly  
 530 535 540  
 Asn Ser Val Leu Lys Ser Thr Gln Phe  
 545 550

# 【図面の簡単な説明】

【図 1】 ヒト成人及び胎児の各臓器組織における URT1 遺伝子メッセンジャー RNA の発現をノーザンブロッティングにより解析した結果を示す図。

【図 2】 URT1 遺伝子の cRNA を注入した卵母細胞による尿酸取り込み実験の時間依存性の結果を示す図。

【図 3】 URT1 遺伝子の cRNA を注入した卵母細胞による尿酸取り込み実験の濃度依存性の結果を示す図。

【図 4】 URT1 遺伝子の cRNA を注入した卵母細胞による尿酸取り込み実験において、添加する塩の影響を調べた結果を示す図。

【図 5】 URT1 遺伝子の cRNA を注入した卵母細胞による尿酸取り込み実験の pH 依存性の結果を示す図。

【図 6】 URT1 遺伝子の cRNA を注入した卵母細胞による尿酸取り込み実験において各有機酸でプレインキュベーションした結果を示す図。

【図 7】 URT1 遺伝子の cRNA を注入した卵母細胞による尿酸取り込み実験において、非標識の乳酸 (100 mM, 100 n l) をあらかじめ注入した影響を調べた結果を示す図。

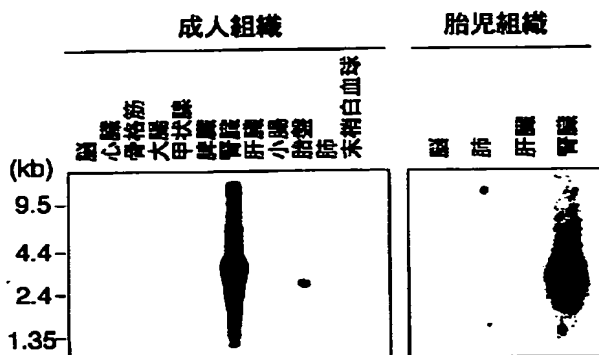
【図 8】 URT1 遺伝子の cRNA を注入した卵母細胞による尿酸取り込み実験において、系への各種有機酸もしくはその類似化合物添加の影響を調べた結果を示す図。

【図 9】 URT1 遺伝子の cRNA を注入した卵母細胞による尿酸取り込み実験において、系への各種濃度のプロベネシド添加の影響を調べた結果を示す図。

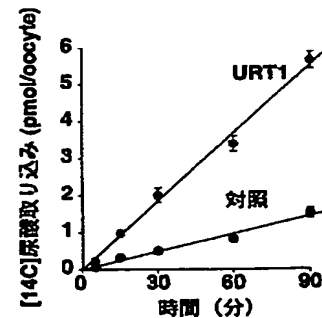
【図 10】 URT1 遺伝子の cRNA を注入した卵母細胞による尿酸取り込み実験において、系への各種濃度のロサルタン添加の影響を調べた結果を示す図。

【表 1】 ヒトゲノムにおける URT1 遺伝子のエクソン-イントロン構造を示す図。

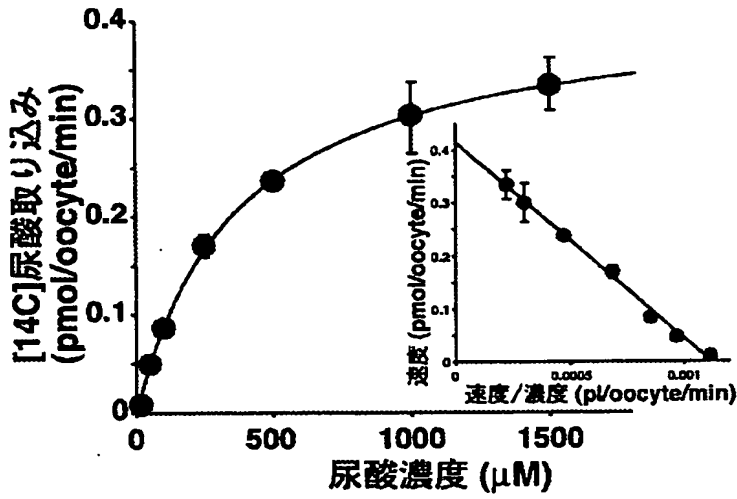
【図 1】



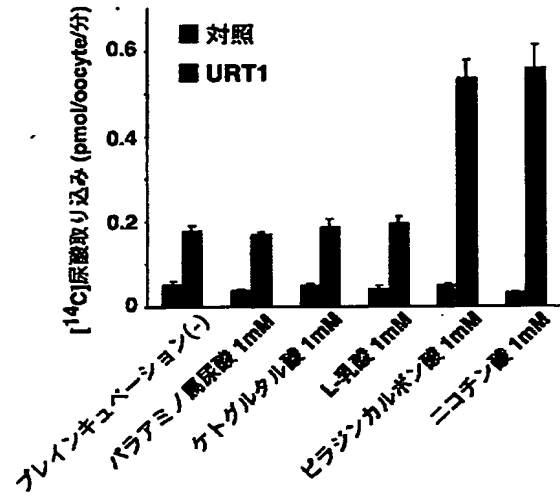
【図 2】



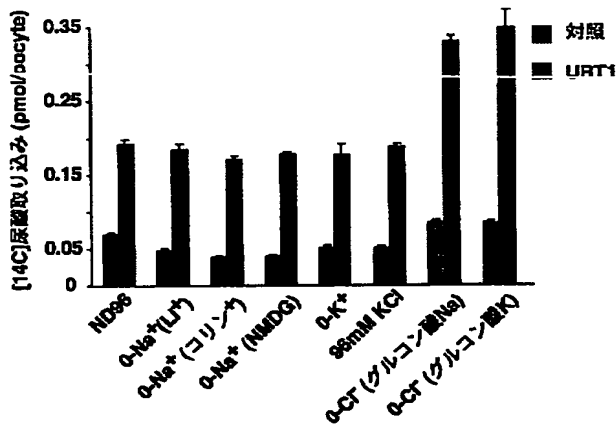
【図 3】



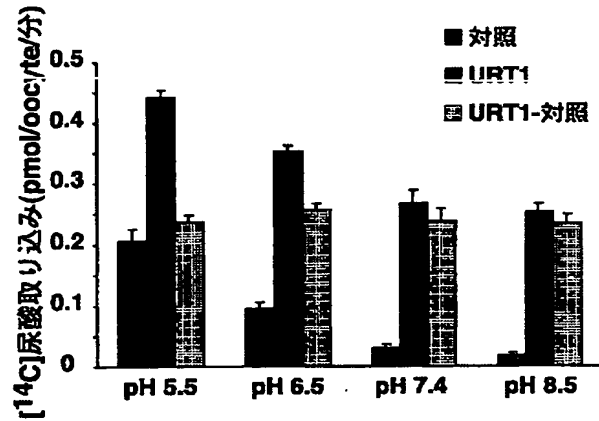
【図 6】



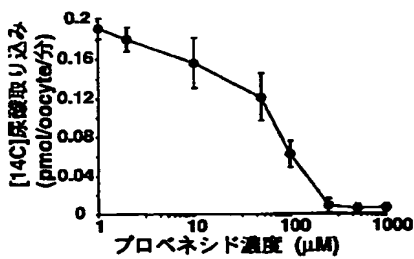
【図 4】



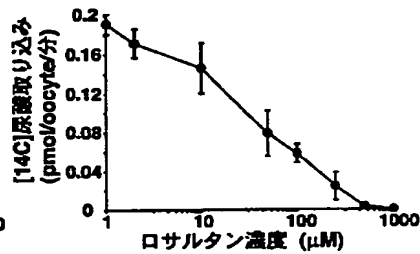
【図 5】



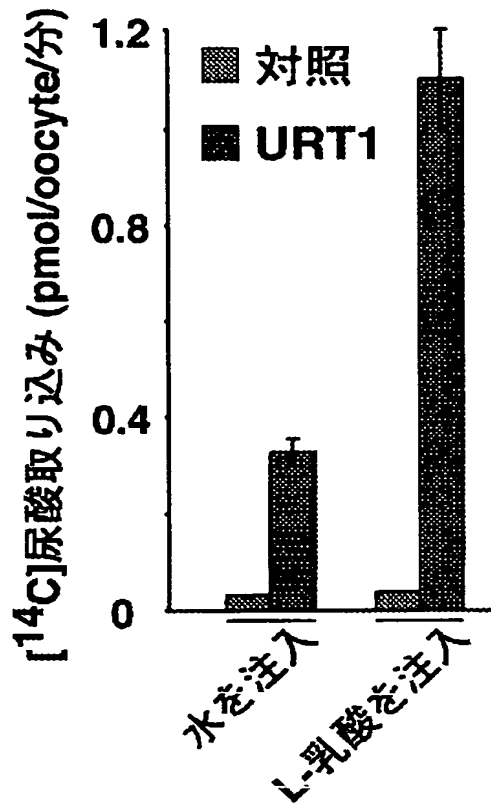
【図 9】



【図 10】



【図7】

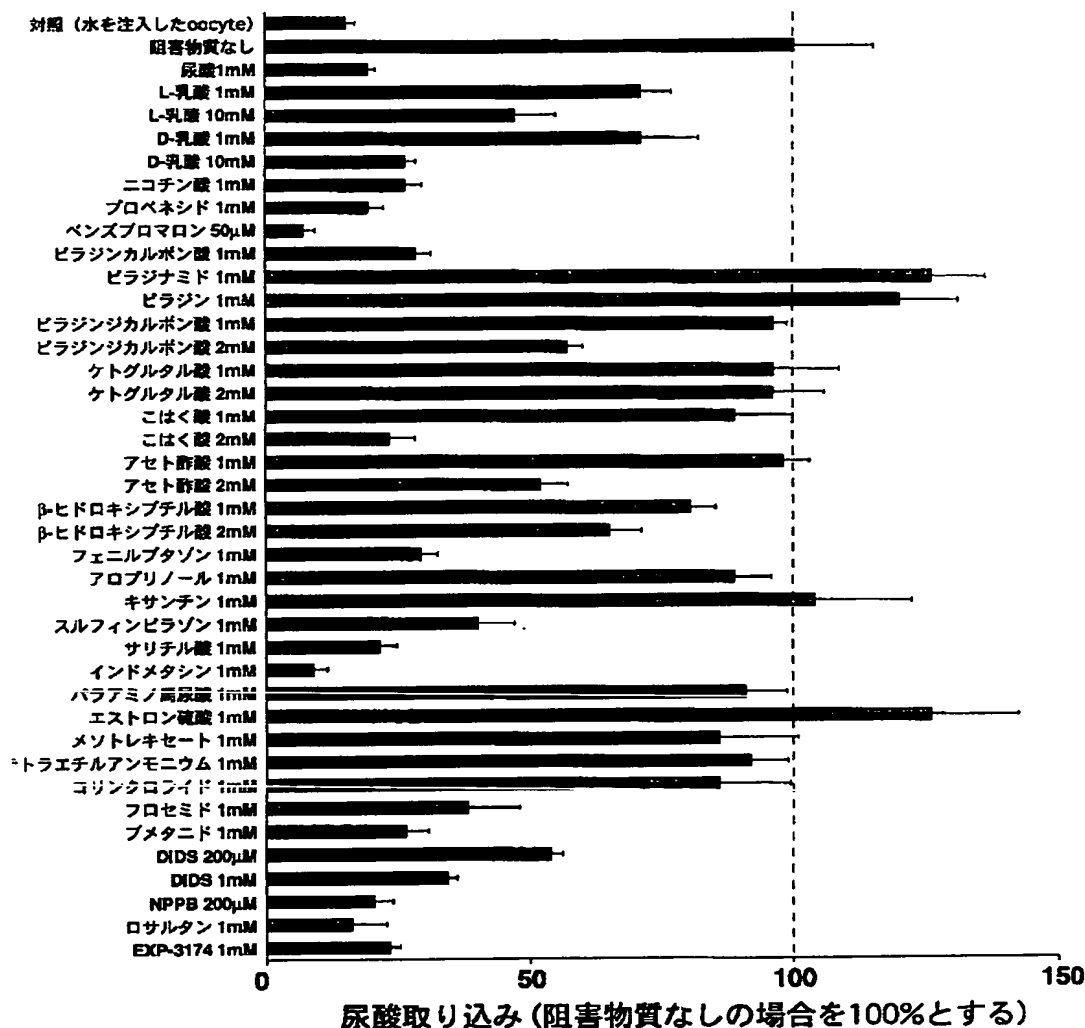


【図11】

## URT1遺伝子のエクソン-イントロン構造

エクソン			イントロン			エクソン		
番号	サイズ(bp)	3' 結合部	5' 結合部	サイズ(bp)	番号	3' 結合部	5' 結合部	番号
1	588	...GTGGCCAAG	GTAGGGGCT...	819	1	...TCCATCAG	TGGAAOCTC...	2
2	104	...CTCAGACAG	GTGAGTACC...	521	2	...GTGCCGCAG	GTTTGGGCG...	3
3	155	...GCACTCTCC	GTAGGTCTC...	74	3	...TCCTTGACAG	TGATGGAGT...	4
4	189	...GTACTOCTG	GTGGGTGCT...	4247	4	...CCACTTAAG	GTGGCTGGC...	5
5	124	...ACCCCTGAG	GTAAGGCTG...	187	5	...CCTCCACAG	GTCTTGCTT...	6
6	118	...GTTGTGCTG	GTAGATGCC...	751	6	...CTGCCCCAG	GTTGCGCTT...	7
7	215	...TGCCCAACG	GTGAGGGGG...	475	7	...TACCCACAG	AAATGGGGG...	8
8	109	...TGTGCTCAG	GTGAGGCTG...	258	8	...CATTTGCAG	GATGACGGC...	9
9	204	...GCAGAACCA	GTGAGTGGA...	548	9	...CCTGAACAG	GGCAGTAAA...	10
10	857	...ACAAATGAA						

【図 8】



## 【手続補正書】

【提出日】平成13年9月28日(2001. 9. 28)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正内容】

【0011】本発明の尿酸トランスポーターURT1(urate transporter1)は、尿酸およびその類似物質を細胞膜を介して一方より他方に輸送する能力を有し、さらに細胞膜の他方の陰イオンを交換基質とする交換輸送体(urate/anion exchanger)である。本発明のタンパク質としては、配列番号1で示されたアミノ酸配列を有するもののほか、例えば、配列番号1で示されたアミノ酸配列にお

いて1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有するものが挙げられる。アミノ酸の欠失、置換もしくは付加は、尿酸輸送活性が失われない程度であればよく、通常1〜約110個、好ましくは1〜約55個である。このようなタンパク質は、配列番号1で示されたアミノ酸配列と通常、〜75%、好ましくは〜90%のアミノ酸配列の相同性を有する。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0020

【補正方法】変更

【補正内容】

【0020】尿酸トランスポーターURT1をコードするcDNAとしては、例えば、配列1に示される塩基配列を有するcDNAを用いることが出来るほか、前記の

cDNAに限定されることなく、アミノ酸配列に対応するDNAを設計し、ポリペプチドをコードするDNAを用いることもできる。この場合、一つのアミノ酸をコードするコドンは各々1～6種類知られており、用いるコドンの選択は任意でよいが、例えば発現に利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、より発現の高い配列を設計することができる。設計した塩基配列をもつDNAはDNAの化学合成、前記cDNAの断片化と結合、塩基配列の一部改変等によって取得できる。人為的な塩基配列の一部改変、変異導入は、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用して部位変異導入法 (site specific mutagenesis) 「Mark, D. F. ら, Proc Natl Acad Sci USA 第18巻、5662-5666頁、1984年」等により実施できる。

#### 【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0026

【補正方法】変更

【補正内容】

【0026】実施例1 腎臓及び胎盤特異的尿酸トランスporter (URT1) cDNAの単離とその解析

既に我々が単離したOAT1、OAT2、OAT3、及びOAT4の塩基配列情報をもとに、公開されているヒトゲノム計画の解析結果をホモロジー探索プログラムを用いて探索した。この結果、OAT1、OAT2、OAT3、OAT4と相同性を有する新規遺伝子断片を複数得た。この中で、OAT4の遺伝子座位にきわめて近い新規遺伝子断片の1つを解析し、その中に開始コドンと思われる部位を同定した。この開始コドンの同定は新規遺伝子断片をOAT1及びOAT4の遺伝子配列と比較することにより得られた。予測された開始コドンの3'側上流に特異的プライマーを28塩基を用いて作製し、ヒトの様々な組織由来のメッセンジャーRNAを用いた3'-RACE (3'-rapid amplification of cDNA ends) 法により、この新規遺伝子の単離を試みた。その結果、ヒト腎臓メッセンジャーRNAを用いた3'-RACE法により単一のクローン (URT1) を得た。PCR法により得られた単一のバンドをTAクローニング法を用いて、pCRII-TOPOベクターにサブクローン化したのち、さらに発現ベクターであるpcDNA 3.1 (+)ベクターにサブクローン化した。この結果、尿酸輸送活性を持つ新規cDNA (URT1 cDNA) が得られた (輸送機能解析については以下参照)。上記により得られたcDNA (URT1 cDNA) の塩基配列の決定は、特異的プライマーを用いて、自動シーケンサー (アプライドバイオシステム社製) によりおこなった。

(配列番号1に記載)

ヒトの各組織におけるUAE1遺伝子の発現 (ノーザンブロットング) の解析を行った (図1)。URT1 cDNAの全長を<sup>32</sup>P-dCTPでラベルし、これをプローブとして用いて、ヒトの種々の組織から抽出したRNAをブロットングしたフィルター (クロンテック社製) を用いてハイブリダイゼーションを行った。標識後のUAE1 cDNA全長を含んだハイブリダイゼーション液で一晩ハイブリダイゼーションを行い、フィルターを65℃にて、0.1% SDSを含む0.1x SSCで洗浄した。ノーザンブロットの結果、腎臓に加えて胎盤組織において、強いバンドが検出された。ヒト胎児組織では腎臓においてバンドが検出された。

(削除)

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0027

【補正方法】変更

【補正内容】

【0027】実施例2 尿酸トランスporter機能の解析

URT1 cDNAを含むプラスミドから、T7 RNAポリメラーゼを用いて、*in vitro*でcRNA (cDNAに相補的なRNA) を調製した (Sekine, T., et al., J. Biol. Chem., 第272巻、18526-18529頁、1997年参照)。得られたcRNAを、既に報告されている方法に従い (Sekine, T., et al., J. Biol. Chem., 第272巻、18526-18529頁、1997年)、アフリカツメガエルの卵母細胞に注入し、この卵母細胞について放射能標識された尿酸による取り込み実験を行った。この結果、図2に示すようにURT1を発現させた卵母細胞は [<sup>14</sup>C] 尿酸の取り込みを示すことが判明した。URT1を発現させた卵母細胞は [<sup>14</sup>C] 尿酸の取り込みの時間依存性を示した。このことから、URT1は単に尿酸と結合するだけではなく、細胞内に輸送するトランスporterであることが示された。有機イオントランスporterファミリーの代表的な基質である [<sup>14</sup>C] PAH (パラアミノ馬尿酸) 及び [<sup>14</sup>C] TEA (テトラエチルアンモニウム) の取り込みは認められなかった (図には示さず)。URT1の尿酸輸送のミカエリスメンテン動力学試験をおこなった。種々の濃度の尿酸のURT1による取り込み量の変化を調べることにより、尿酸のURT1による輸送の濃度依存性を検討した。放射能標識された尿酸の取り込み実験は、URT1 cRNAを注入した卵母細胞を用い、前記記載方法に準じて実施した。この結果 (図3)、尿酸の取り込みのKm値 (ミカエリス定数) は約372 ± 25mMであった。URT1の尿酸輸送における各種電解質の影響



を検討した(図4)。細胞外ナトリウムをリチウム、コリン及びN-メチル-D-グルカミン(NMDG)に置換した場合、URT1を介した尿酸の輸送は変化せず、URT1が細胞外ナトリウム非依存性の尿酸トランスポーターであることが明らかとなった。細胞外のカリウムイオンをすべてナトリウムで置換した場合(図4, 0-K<sup>+</sup>)、およびナトリウムをすべてカリウムイオンで置換した場合(96mM KCl)も尿酸の輸送は変化せず、URT1細胞膜電位に非依存性であることが明らかとなった。細胞外のクロライドイオンをグルコン酸で置換した場合、尿酸の取り込みは有意に増加した。単離細胞膜小胞系などをを用いた実験系により、ヒト腎臓の尿管管腔側に、尿酸とクロライドイオンの交換輸送体の存在が示されており、本実験結果もクロライドが尿酸との交換基質となることを示唆するものといえる。URT1の尿酸輸送におけるpH依存性を検討した。図5に示すように、細胞外のpHをより酸性にしたところ、URT1 cRNAを注入した卵母細胞の尿酸輸送は増加したが、これは水を注入した卵母細胞(対照)における尿酸の非特異的吸着が原因と考えられた。実質の尿酸輸送(URT1-対照)はpHによって変化しなかった。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0029

【補正方法】変更

【補正内容】

【0029】実施例4 尿酸トランスポーターの阻害物質のスクリーニング  
URT1の基質選択性をさらに検討するために、URT1 cRNAを注入した卵母細胞による[<sup>14</sup>C]尿酸の取り込み実験系において、系へ各種物質を添加し、その影響を調べた(阻害実験)。<sup>14</sup>C尿酸の取り込み実験は、URT1 cRNAを注入した卵母細胞を用い、前記記載方法に準じて実施した(図8, 9, 10)。図8に示した濃度の各種化合物(非標識)の存在下および非存在下で、50mM [<sup>14</sup>C]尿酸の取り込みをpH 7.4の条件下で測定した。その結果、種々のモノカルボン酸(L-乳酸、D-乳酸、ニコチン酸、ピラジニカルボン酸)はURT1による[<sup>14</sup>C]尿酸の輸送を有意に阻害した(図8)。ジカルボン酸であり、OAT1の交換基質となりうるケトグルタル酸はpH 7.4の条件下では阻害しなかった。ピラジニカルボン酸と似た構造をもつピラジンジカルボン酸はやや弱い阻害効果を示した。パラアミノ馬尿酸やテトラエチルアンモニウムのようなアニオン性物質及びカチオン性物質は阻害作用を示さなかった(図8)。高尿酸血症の治療に用いられているプロベネシド、ベンズプロマロン、

スルフィンピラゾン、フェニルブタゾンなどの薬剤は、URT1における尿酸の取り込みを有意に阻害した。また高血圧治療薬であるロサルタンは、尿酸排泄促進作用があることが知られているが、ロサルタンもその代謝産物であるEXP-3174と同様にURT1の尿酸の取り込みを有意に阻害した。以上の結果から、URT1は現在臨床で用いられている代表的な尿酸排泄促進薬の作用点である。プロベネシドとロサルタンの様々な濃度を用いて、URT1における尿酸取り込み作用に対する阻害効果を調べた(図9及び図10)。IC50値はそれぞれ約50mM、20mMであった。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正内容】

【図面の簡単な説明】

【図1】 ヒト成人及び胎児の各臓器組織におけるURT1遺伝子メッセンジャーRNAの発現をノーザンブロットングにより解析した結果を示す図。

【図2】 URT1遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞による尿酸取り込み実験の時間依存性の結果を示す図。

【図3】 URT1遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞による尿酸取り込み実験の濃度依存性の結果を示す図。

【図4】 URT1遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞による尿酸取り込み実験において、添加する塩の影響を調べた結果を示す図。

【図5】 URT1遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞による尿酸取り込み実験のpH依存性の結果を示す図。

【図6】 URT1遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞による尿酸取り込み実験において各有機酸でプレインキュベーションした結果を示す図。

【図7】 URT1遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞による尿酸取り込み実験において、非標識の乳酸(100mM, 100nM)をあらかじめ注入した影響を調べた結果を示す図。

【図8】 URT1遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞による尿酸取り込み実験において、系への各種有機酸もしくはその類似化合物添加の影響を調べた結果を示す図。

【図9】 URT1遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞による尿酸取り込み実験において、系への各種濃度のプロベネシド添加の影響を調べた結果を示す図。

【図10】 URT1遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞による尿酸取り込み実験において、系への各種濃度のロサルタン添加の影響を調べた結果を示す図。

【図11】 ヒトゲノムにおけるURT1遺伝子のエクソ-イントロン構造を示す図。

## 【手続補正書】

【提出日】平成13年10月30日（2001. 10. 30）

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正内容】

【図面の簡単な説明】

【図1】ヒト成人及び胎児の各臓器組織におけるURT1遺伝子メッセンジャーRNAの発現をノーザンブロッティングにより解析した結果を示す図。

【図2】URT1遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞による尿酸取り込み実験の時間依存性の結果を示す図。

【図3】URT1遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞による尿酸取り込み実験の濃度依存性の結果を示す図。

【図4】URT1遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞による尿酸取り込み実験において、添加する塩の影響を調べた結果を示す図。

【図5】URT1遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞による尿酸取り込み実験のpH依存性の結果を示す図。

【図6】URT1遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞による尿酸取り込み実験において各有機酸でブレインキュベーションした結果を示す図。

【図7】URT1遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞による尿酸取り込み実験において、非標識の乳酸（100mM, 100nM）をあらかじめ注入した影響を調べた結果を示す図。

【図8】URT1遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞による尿酸取り込み実験において、系への各種有機酸もしくはその類似化合物添加の影響を調べた結果を示す図。

【図9】URT1遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞による尿酸取り込み実験において、系への各種濃度のプロベネシド添加の影響を調べた結果を示す図。

【図10】URT1遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞による尿酸取り込み実験において、系への各種濃度のロサルタン添加の影響を調べた結果を示す図。

【図11】ヒトゲノムにおけるURT1遺伝子のエクソン-イントロン構造を示す図。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ' 4	識別記号	F I	ターミナル (参考)	
A 6 1 P	19/06	C 0 7 K	16/18	4 C 0 8 5
C 0 7 K	14/47	C 1 2 N	1/15	4 H 0 4 5
	16/18		1/19	
C 1 2 N	1/15		1/21	
	1/19	G 0 1 N	33/15	Z
	1/21		33/50	Z
	5/10	C 1 2 Q	1/68	A
G 0 1 N	33/15	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/50		5/00	A
// C 1 2 Q	1/68	A 6 1 K	37/02	

F ターム ( 参考 )    2G045   AA40   BA13   BB20   CB01   CB26  
                         DA01   DA12   DA13   DA14   DA36  
                         FB02   FB04  
                         4B024   AA01   AA11   BA80   CA01   CA09  
                                 GA11   HA12  
                         4B063   QA01   QA18   QA19   QQ42   QR32  
                                 QR33   QR55   QS34   QX01  
                         4B065   AA93Y   AB01   AC14   BA02  
                                 CA24   CA25   CA44   CA46  
                         4C084   AA02   AA07   AA17   BA01   BA08  
                                 BA22   BA23   BA44   CA18   CA25  
                                 CA53   NA14   ZC312  
                         4C085   AA13   AA14   BB11   EE01  
                         4H045   AA10   AA11   AA20   BA10   CA40  
                                 EA20   EA50   FA74